

SONDERDRUCK AUS

# KLINISCHE WOCHENSCHRIFT

ORGAN DER GESELLSCHAFT DEUTSCHER NATURFORSCHER UND ÄRZTE  
VERLAG VON JULIUS SPRINGER, BERLIN, UND J. F. BERGMANN, MÜNCHEN

JAHRG. 19

27. APRIL 1940

Nr. 17, S. 399/401

## VITAMIN C-NACHWEIS IM HARN.

Von

L. ARMENTANO.

Aus der Medizinischen Klinik (Dir.: Prof. Dr. ST. RUSZNYÁK) der kgl.-ung. Franz  
Joseph-Universität in Szeged, Ungarn.

Die verschiedenen, dem Nachweis des Vitamins C dienenden Verfahren trachten alle, die größtmögliche Spezifität aufzuweisen. Da diese Reaktionen zum größten Teil auf der reduzierenden Eigenschaft des Vitamins C beruhen, stellte die Gegenwart von anderen reduzierenden Stoffen im Untersuchungsmaterial — Harn, Gewebe usw. — das Haupthindernis dar. Die quantitative Bestimmung der Ascorbinsäure wird insbesondere durch die Sulphydril-Derivate-Cystein, Cystin, Glutathion, Ergothionein usw. — gestört.

Die verschiedenen Verfasser versuchten diese Fehlerquellen auf verschiedene Art zu beseitigen; diese Bestrebungen galten insbesondere dem Jod- und dem 2-6-Dichlorphenolindophenol-Verfahren (TILLMANS). HARRIS und RAY, v. EULER, v. EEKELEN u. a. suchten dieses Ziel durch die starke Säuerung der Lösung zu erreichen, EMMERIE fällte die reduzierenden Stoffe mit Quecksilberacetat, AMMON und HINSBERG fügten bei Anwendung des Jodverfahrens KJ hinzu, TAUBER und KLEINER verwendeten das aus Cucurbita maxima (Kürbis) bzw. WACHHOLDER das aus Blumenkohl hergestellte, die Ascorbinsäure spezifisch oxydierende Oxydaseferment.

BONSIGNORE und MARTINI schlugen zur Erzielung der Spezifität andere Wege ein. Sie gingen davon aus, daß das Oxydoreduktionspotential des Methylenblaus geringer sei als jenes des Dichlorphenolindophenols; durch diesen Umstand kommen zahlreiche Verbindungen, durch die die Reaktion zwischen Ascorbinsäure und Dichlorphenolindophenol gestört wird, nicht in Betracht. Da in dem System Methylenblau-Leukomethylenblau das letztere in Gegenwart von Sauerstoff rasch reoxydiert wird, suchten die genannten Forscher Bedingungen, bei denen die Reoxydation gehemmt wird. Dies könne i. E. auf zweierlei Weise, und zwar entweder durch die Einstellung der  $p_H$  des Mediums oder durch die Hinzufügung von Natriumthiosulfat erreicht werden. Da jedoch

durch Natriumthiosulfat im saueren Medium (unter einer gewissen  $p_H$ -Grenze) S abgespalten wird, das auch an sich imstande ist, Methylenblau zu reduzieren, versuchten sie diese Fehlerquelle durch Hinzufügung von Citratpuffer zu beseitigen. Durch diese Modifikation werde die Abspaltung des Schwefels vermieden, Methylenblau wird demnach spontan nicht abgespalten, durch das Natriumthiosulfat wird hingegen die Reoxydation von Leukomethylenblau verhindert. Angenommen, daß Methylenblau und Ascorbinsäure miteinander eine äquimolekulare Reaktion eingehen (Methylenblau = 373: Ascorbinsäure = 176), dann entspricht einem Kubikzentimeter der  $1/10000$ -Methylenblaulösung 0,047 mg Ascorbinsäure. BONSIGNORE und MARTINI betonen jedoch, daß man mit den Fehlerquellen zu rechnen habe, die sich aus der Verunreinigung, aus dem Krystallwassergehalt sowie aus der hygroskopischen Beschaffenheit des Methylenblaus ergeben und daß es daher ratsam sei, den Titer empirisch einzustellen.

BONSIGNORE und MARTINI verwendeten ihr Verfahren ursprünglich zum Nachweis von Vitamin C in Geweben, bedienten sich aber desselben später auch zur Bestimmung des Ascorbinsäuregehaltes des Harnes, des Blutes usw. AMMON und HINSBERG verglichen an der Hand eingehender Versuche das Methylenblauverfahren mit dem Jod- und dem Tillmanschen Verfahren und gelangten zu der Überzeugung, daß man im Harn die niedrigsten Werte mit dem Methylenblauverfahren erhalte, daß also dieses offenbar den tatsächlichen Werten am ehesten entspreche. Das Methylenblauverfahren fand nach verschiedenen Modifikationen allenthalben Verwendung. WACHHOLDER und HAMEL verwendeten statt der ursprünglich vorgeschriebenen Trichloressigsäure die 4,4proz. Sulfosalicylsäure; LUND und LIECK arbeiteten — unabhängig von BONSIGNORE und MARTINI — ebenfalls ein Verfahren aus, bei dem Methylenblau und verschiedene Pufferlösungen verwendet wurden zur Bestimmung im Harn\*.

Nicht unerwähnt soll bleiben, daß das Methylenblauverfahren zahlreiche Gegner hat, die dem Indophenolverfahren den Vorrang zusprechen (LEY, KAISER, DAGULF). In neuester Zeit erklärten WIDENBAUER und SALM das von WACHHOLDER angewendete Methylenblauverfahren für vollkommen unbrauchbar zur Bestimmung im Harn, da der Harn gewisse Stoffe — wie z. B. die B-Fraktion des Urochroms — enthält, durch die die Reaktion zwischen Methylenblau und der Ascorbinsäure gehemmt wird. Dagegen halten dieselben Forscher das Verfahren von LUND für spezifisch, da sie das

\* 1 ccm Harn wird mit 9 ccm dest. Wasser verdünnt. Hiervon nimmt man 1 ccm in das Titrationsglas, setzt einen Spatel NaCl und eine Messerspitze  $KH_2PO_4$  zu und titriert mit alkoholischer Methylenblaulösung.

dem Harn hinzugefügte Vitamin C restlos wiedererhalten konnten. WACHHOLDER beruft sich in seiner Antwort darauf, zu den Bestimmungen die 10fache Menge der 4,4proz. Sulfo-salicylsäurelösung verwendet zu haben, obwohl er auch so mit einem gewissen Verlust rechnen mußte.

Aus dem Gesagten geht die wichtige Rolle der  $p_H$  hervor, worauf zuerst NEUWEILER aufmerksam gemacht hatte. Auf nachstehender Kurve (Abb. 1) ist deutlich zu sehen, daß dieselbe Vitamin C-Menge (0,1 mg) bei verschiedener  $p_H$  im salicylsauren Medium ganz verschiedene Methylenblaumengen zu reduzieren imstande ist. Während die Ergebnisse bei einer niedrigeren  $p_H$  als 3 bis 4 unverändert bleiben, nimmt die Fähigkeit zu reduzieren bei höheren  $p_H$ -Werten ständig ab. Meiner Ansicht nach sind die großen Unterschiede, die zwischen den mit dem Tillmansschen Verfahren und den mit dem Methylenblauverfahren-gefundenen Ergebnissen bestehen, zum großen Teil mit diesem Umstand zu erklären. Auch wir verglichen nämlich an der Hand von rund 200 Untersuchungen das Tillmanssche Verfahren mit dem Wachholderschen Methylenblauverfahren und fanden dabei Unterschiede von nicht weniger als durchschnittlich 15—20 %; natürlicherweise ergaben die Versuche mit Indophenol stets die höheren Werte.

Anläßlich unserer Nachprüfungen konnten wir bei der Wachholderschen Modifikation des Methylenblauverfahrens 2 Fehlerquellen entdecken:

1. Verwendet man die 10fache Menge der 4,4proz. Sulfo-salicylsäurelösung, dann kann die  $p_H$  des Mediums sehr leicht jenen Punkt erreichen — und sogar auch oft überholen —, bei dem aus dem Thiosulfat Schwefel abgespalten wird, der das Methylenblau weiter reduziert und somit die Bestimmung unbrauchbar macht. Dies geht auch daraus hervor, daß sich die untersuchte Lösung durch das gefällte S sehr oft trübt.

2. Im sulfosalicylsauren Medium war der empirische Titer niemals zu erhalten, obwohl wir sämtliche Vorschriften genauestens eingehalten hatten (500-Watt-Nitraphot-B-Lampe, Entfernung der Lichtquelle, Kühlvorrichtung, Methylenblau purissimum Merck, die nötige  $p_H$  usw.). Im sulfosalicylsauren Medium schwankte der auf 1:10000 Methylenblau bezogene Titer zwischen 0,15 und 0,16 mg, was dem 3fachen theoretischen Titer entspricht. Da der Titer ohne Thiosulfat bedeutend höher liegt, darf man darauf schließen, daß die Reduktion des Methylenblaus durch die Sulfosalicylsäure bis zu einem gewissen Maße gehemmt werde. Hiermit im Zusammenhang ist zu bemerken, daß durch die einzelnen Verfasser verschiedene Titer angegeben werden: WIDENBAUER und SALM, LUND und LIECK, WACHHOLDER erhielten dem theoretischen Wert nahestehende Ergebnisse, während NEU-

WEILER den Faktor 0,1 und AMMON und HINSBERG 0,087 im trichlorsauren Medium fanden (der erstere verwendete 8,8proz., die letzteren verwendeten 4proz. Trichloressigsäure). NEUWEILER hält die Anwendung von Thiosulfat im trichlorsauren Medium für überflüssig; dies stimmt mit unseren Erfahrungen überein, jedoch bedarf es dann eines 20proz. trichlorsauren Mediums: 1 ccm Harn, 1 ccm 40proz. Trichloressigsäure, 2 ccm Citratpuffer,  $p_H = 2,8-2,9$ . Bei stärkerer Verdünnung der Trichloressigsäurelösung nimmt der

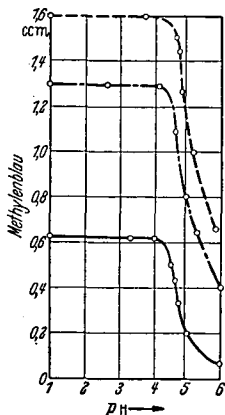


Abb. 1.

— — — Die Methylenblau reduzierende Fähigkeit von 0,1 mg Vitamin C in Gegenwart von Acetat-Puffer bei verschiedener  $p_H$ ;  
 - · - · - dasselbe im trichloressigsäuren Medium;  
 — dasselbe im sulfosauren Medium.

Titer wegen der Erhöhung der  $p_H$  allmählich zu. Bei der hier angegebenen Einstellung betrug der Titer 0,083, was dem theoretischen Wert bedeutend nähersteht. Da auch bei dem durch LUND und LIECK empfohlenen Verfahren 1 cm (1:10000) Methylenblau 0,12 mg Vitamin C entspricht, versuchten wir ein Medium zu finden, durch das in dem Ascorbinsäure-Methylenblau-Oxydoreduktionssystem die Reaktion durchaus nicht beeinflusst wird, indem die Reoxydation des Leukomethylenblaus nicht zu rasch erfolgt und dabei ein Wert erreicht wird, der dem theoretischen Titer nahesteht. Ein derartiges System fand ich im Acetatpuffer. Wie auf der Abb. 1 zu sehen, kann dieselbe Vitamin C-Menge (0,1 mg in 2proz. Metaphosphorsäure gelöst) bei derselben  $p_H$ , aber in einem anderen System, Methylenblau in recht verschiedenen Mengen reduzieren. Diese Reduktionsfähigkeit hängt auch bei Verwendung des Acetatpuffers bis zu einem gewissen Grade von der  $p_H$  des Mediums ab.

Bei einer  $p_H$  von über 4,4 nehmen die Werte ebenso ab wie in jedem anderen Medium. Bei der Bestimmung der Ascorbinsäure im Harn hat man natürlich für die nötige  $p_H$  zu sorgen.

Im Harn wird dies dadurch erreicht, daß man 1 ccm (bei höherem Vitamin C-Gehalt 0,2 ccm) des Harnes mit wenigen Tropfen Eisessig sowie mit 5,2 ccm  $\frac{1}{10}$ -Essigsäure- und 0,5 ccm  $\frac{1}{10}$ -Natriumacetatlösung versetzt und hierauf mit der 500-W-Nitraphot-B-Lampe — höchstens 1 Minute lang — beleuchtet. Vergleichshalber wird ein ebensolches, aus destilliertem Wasser und 0,2 ccm Methylenblau bestehendes System ebenfalls 1 Minute lang bestrahlt. Titrieren mit einer 1:10000 Methylenblaulösung. Faktor = 1 ccm Methylenblau entspricht 0,063 mg Vitamin C. Es ist wichtig, daß die Methylenblaulösung nicht mit  $Cu^{++}$ ,  $Fe^{++}$ -Ionen ver-

unreinigt sei, da schon eine ganz geringe Menge derselben imstande ist, die Reaktion vollkommen zu verhindern; das bei der Reaktion infolge der reduzierenden Wirkung der Ascorbinsäure entstehende Leukomethylenblau reduziert nämlich die  $C^{++}$ ,  $Fe^{+++}$ -Ionen sofort zu  $Cu^{+}$ ,  $Fe^{++}$ -Ionen. So kann z. B. die methylenblaureduzierende Wirkung von 0,1 mg Ascorbinsäure durch 0,1—0,2 ccm einer 1proz.  $CuSO_4$ -Lösung vollständig hintangehalten werden. In demselben System kann jedoch die Reaktion des Dichlorphenolindophenols trotz der Gegenwart der  $Cu^{++}$ -Ionen unbeeinträchtigt ablaufen. Diese Feststellung erscheint mir um so wichtiger, da F. B. STRAUB bei der im Dunklen ablaufenden Reaktion zwischen Methylenblau und der Ascorbinsäure die katalytische, beschleunigende Wirkung der Cupri-Ionen beobachten konnte.

Um die Brauchbarkeit des Verfahrens zu prüfen, führte ich folgende Untersuchungen aus: 1. bediente ich mich zu den Bestimmungen im selben Harn der verschiedenen Methylenblauverfahren (s. Tabelle 1); es zeigte sich, daß die größte

Tabelle 1. Die Fähigkeit gleicher Harnmengen Methylenblau (1:10000) in verschiedenen Medien zu reduzieren.

Diagnose	10 ccm 4,4 proz. Sulfosalicyl- säure	1 ccm 40 proz. Tri- chlorressig- säure	5 ccm <sup>n/10</sup> Essigsäure + 0,5 ccm Na-Acetat	Verfahren nach LUND
	Methylenblau in Kubikzentimetern			
Purpura vasc. . . . .	0,5	0,9	1,22	0,71
Pleuritis . . . . .	0,61	1,0	1,5	0,7
Lymphogranulomatosis	8,7	11,0	15,5	—
Gastritis . . . . .	0,8	1,5	2,5	0,85
Ulcus ventriculi . . . .	0,9	1,7	2,7	1,0
Ulcus ventriculi . . . .	0,3	0,8	1,7	0,5
Lymphogranulomatosis	1,4	—	3,2	1,8
Ischias . . . . .	0,9	—	1,8	1,25
Ischias . . . . .	0,4	0,8	1,0	—
Ischias . . . . .	1,1	1,7	3,1	1,5
Peritonitis tbc. . . . .	0,1	0,12	0,17	—

Menge des Methylenblaus bei Verwendung desselben Harnes in Gegenwart des Acetatpuffers reduziert werde. Hierauf folgen der Reihe nach, an der reduzierten Methylenblaumenge gemessen, das essigsäure Medium, das Verfahren nach LUND und schließlich die Bestimmung im sulfosalicylsauren Medium. Bei Verwendung der Vitamin C-Lösung bestand zwischen den einzelnen Verfahren nahezu dasselbe Verhältnis, so, daß auch die Ergebnisse einander nahestehen; eine Ausnahme bildet das Verfahren nach LUND, mit dem wir im Vitamin C in stärkerer Konzentration enthaltenden Harn wesentlich niedrigere Werte erhielten, worauf auch schon DAGULF aufmerksam gemacht hatte. Mit dem Verfahren nach TILLMANS erhielten wir hingegen stets höhere Werte als bei sämtlichen

Methylenblauverfahren. Der Unterschied schwankte zwischen 5 und 25 %, je nach der Ascorbinsäurekonzentration des Harnes.

2. Wir untersuchten ferner, in welchem Maße die den verschiedenen Harnen in verschiedenen Mengen beigemengte Ascorbinsäure mit Hilfe der einzelnen Verfahren quantitativ zurückzubekommen sei. Während GABBE, ferner WIDENBAUER und SALM die dem Harn im sulfosalicylsauren Medium beigemengte Ascorbinsäure nicht wiedergewinnen konnten, gelang es NEUWEILER, FERRAND und POLICARD, diese im trichloressigsaurigen Medium bei entsprechender  $p_H$  restlos wieder zu erhalten.

Bei unseren Versuchen konnten wir die dem Harn beigemengte Ascorbinsäure mit keinem der Verfahren vollständig wieder auffinden (s. Tabelle 2). Bei der Beimengung kleiner Mengen (10 mg) Ascorbinsäure betrug der Verlust bei dem Methylenblauverfahren sowohl in Gegenwart der Sulfosalicylsäure wie auch in Gegenwart des Acetattuffers etwa 2 mg (20 %), bei größeren Mengen (50 mg) betrug der Verlust etwa 3—7 mg (6—14 %). Bei Verwendung des Tillmansschen Verfahrens betrug jedoch der Verlust auch bei kleinen Mengen Vitamins C 20 %, manchmal sogar noch mehr. Scheinbar gibt es also im Harn tatsächlich Stoffe, die — ähnlich wie die Schwermetallsalze — die Reaktion zwischen Ascorbinsäure und Methylenblau verhindern. Diese Hemmung nimmt aber unseres Erachtens niemals die Maße an, wie sie WIDENBAUER und SALM annahmen, insbesondere dann nicht, wenn für die entsprechende  $p_H$  gesorgt und statt Sulfosalicylsäure Acetattuffler verwendet wird.

*Zusammenfassung:* Bei der Bestimmung der Ascorbinsäure mit Methylenblau hat man mit zahlreichen Fehlerquellen zu rechnen; um diese zu vermeiden, ist es besonders wichtig, die  $p_H$  jenes Mediums, in dem die Reaktion vor sich geht, genau einzustellen. Auch bei der Einstellung der Versuchsbedingungen auf dieselbe  $p_H$  hängt aber die Fähigkeit der Ascorbinsäure, Methylenblau zu reduzieren, in hohem Maße vom Puffersystem ab. Da dieselbe Vitamin C-Menge auch bei optimaler  $p_H$  die größte Methylenblaumenge in Gegenwart von Acetattuffler reduzieren kann, wodurch der theoretische Titer am ehesten erreicht wird, ist dieses System als das geeignetste anzusprechen. Diese Ansicht erscheint um so mehr berechtigt, da das in der ursprünglichen Vorschrift von BONSIGNORE und MARTINI die Rolle des Katalysators spielende Natriumthiosulfat vollkommen überflüssig geworden ist, so daß man auch nicht mehr mit der Fehlerquelle zu rechnen hat, daß der im stark saueren Medium abgespaltene Schwefel das Methylenblau weiter reduziere. Die zwischen Methylenblau und der Ascorbinsäure ablaufende Reaktion

Tabelle 2.

Diagnose, Tagesharnmenge	Ascorbinsäuregehalt des Harnes in Milligramm		Hinzugefügte Ascorbinsäure mg	Berechnete Werte in Milligramm		Erhaltene Werte in Milligramm		Verlust in Milligramm			
	T*	B+M*		T	B+M	T	B+M	T		B+M	
Ulcus ventriculi 670 ccm	2,4	0	+10	12,4	10,0	6,9	8,7	5,5	55%	1,3	13%
Endokarditis 930 ccm .	3,5	3,4	+10	13,5	13,4	7,1	13,2	6,4	64%	0,2	2%
Hypertonie 1000 ccm . .	6,6	3,3	+10	16,6	13,3	14,8	13,0	1,8	18%	0,3	3%
Cholelithiasis 1500 ccm .	5,5	1,7	+10	15,5	11,7	11,0	8,95	4,0	40%	2,8	28%
Myodeg. cord. 500 ccm .	12,0	2,0	+10	22,0	12,0	20,5	10,5	1,5	15%	1,5	15%
Peritonitis tbc. 650 ccm	11,0	6,6	+10	21,0	16,6	19,5	13,6	1,5	15%	3,0	30%
Vitium 1500 ccm . . .	3,4	1,5	+50	53,4	51,5	50,2	44,5	3,2	6,4%	7,0	14%
Pleuritis 1500 ccm . . .	6,0	0	+50	56,0	50,0	53,0	43,5	3,0	6,0%	6,5	13%
Ulcus ventriculi 1500 ccm	4,2	0	+50	54,2	50,0	50,1	48,1	4,1	8,2%	1,9	3,8%

\* T = TILLMANS, B+M = BONSIGNORE-MARTINI.

wird durch die Cupri- und Ferri-Ionen in großem Grade gestört, da diese durch das entstehende Leukomethylenblau sofort zu Cupro- und Ferro-Ionen reduziert werden. Die reduktorische Wirkung von 0,1 mg Ascorbinsäure wird durch 0,1—0,2 ccm der 1proz. Cuprisulfatlösung scheinbar vollkommen gehemmt. Die zur Verwendung gelangende Methylenblaulösung und das Untersuchungsmaterial müssen daher vollkommen frei von Cupri- und Ferri-Ionen sein. Im Harn gibt es zweifellos Stoffe (Urochrom B), durch die die reduzierende Wirkung der Ascorbinsäure gehemmt wird, bei entsprechender  $p_H$  und bei Verwendung des Acetatpuffers erreicht jedoch der durch die Hemmung entstandene Verlust bloß mäßige Grade. Der Verlust beträgt bei geringen Mengen (10 mg) höchstens 30 %, bei größeren Ascorbinsäuremengen (50 mg) 6—14 %.

Literatur: AMMON u. HINSBERG, Klin. Wschr. 1936 I, 85. — BONSIGNORE u. MARTINI, Biochem. Z. 273, 170 (1934). — DAGULF, Ascorbinsäurestudien usw. Göteborg 1939. — EMMERI u. EEKELEN, Biochemic J. 268, 1153 (1939). — FERRAND u. POLICARD, Klin. Wschr. 1937 I, 347. — GABBE, Klin. Wschr. 1936 I, 292. — HARRIS u. RAY, Lancet 1935, 71. — KAISER, Angew. Chem. 1936, 752. — LEY, Arch. Gynäk. 164, 408 (1937). — LUND u. LIECK, Klin. Wschr. 1937 I, 748. — NEUWEILER, Klin. Wschr. 1936 I, 854. — STRAUB, Hoppe-Seylers Z. 254, 192 (1938). — TAUBER u. KLEINER, J. of biol. Chem. 108, 563; 110, 559 (1935). — WACHHOLDER u. PODESTA, Hoppe-Seylers Z. 239, 149 (1936). — WACHHOLDER u. HAMEL, Klin. Wschr. 1937 I, 10. — WACHHOLDER, Klin. Wschr. 1938 II, 1661. — WIEDENBAUER u. SALM, Klin. Wschr. 1938 II, 1407.